Aus dem Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. J. Peiffer

LIPIDCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN FETEN MIT SPHINGOLIPIDOSEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Thomas Schlipf
aus Nagold

1978

Aus dem Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. J. Peiffer

LIPIDCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN FETEN MIT SPHINGOLIPIDOSEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Thomas Schlipf
aus Nagold

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. H. J. Mallach
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. K. Harzer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. U. Breyer-Pfaff

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung	1
Material und Methodik	2
Dünnschichtchromatographie	2
Säulenchromatographie	4
Charakterisierung der "Substanz X"	5
Untersuchung auf Metachromasie	5
Ergebnisse	6
Diskussion	8
Methodik	9
Kontrollfet	10
Fet mit MLD^{+}	11
Fet mit GM_2-Gangliosidose	13
Fet mit NPC^{++}	14
Fet mit M. Krabbe	15
Danksagungen	17
Zusammenfassung	18
Literatur	19
Legenden zu den Abbildungen	24
Abbildungen	29
Gangliosid-Formelschema	35
Tabellen	36

$^{+}$ Abkürzung für "Metachromatische Leukodystrophie"

$^{++}$Abkürzung für "M. Niemann-Pick Typ C"

EINLEITUNG

Recessiv-erbliche Stoffwechselkrankheiten, wie M. Niemann-Pick (Typ A; Fredrickson and Sloan,+ 1972), GM_2-Gangliosidosen (Sloan and Fredrickson+, 1972), metachromatische Leukodystrophie (Moser+, 1972) und globoidzellige Leukodystrophie (Suzuki and Suzuki+, 1972), sind neurodegenerative, im Kindesalter fatal endende Störungen des Sphingolipid-Stoffwechsels. Sphingolipide sind polare Lipide, die Acyl-Sphingosin (=Ceramid) enthalten. Die Krankheiten sind biochemisch-genetisch meist durch die Defekte Sphingolipid-abbauender Enzyme charakterisiert. Die Enzymdefekte bedingen den Lipidanstau (Sphingolipidose), der zwar bei der globoidzelligen Leukodystrophie nicht so auffällig ist, daß er die fortschreitende Zerstörung von Nervengewebe ohne weiteres erklärt, aber bei den anderen Sphingolipidosen zweifellos einen entscheidenden pathogenetischen Faktor darstellt. Da es möglich ist die Aktivität der Enzyme in gezüchteten Amnionzellen zu messen, können die meisten Sphingolipidosen im pränatalen Stadium diagnostiziert werden. Der Typ C des M. Niemann-Pick ist biochemisch schwieriger zu diagnostizieren, da hier nur eine Teilerniedrigung eines Lipid-abbauenden Enzyms vorliegt, aber nicht in allen Fällen nachweisbar ist. Quantitative Bestimmungen der Lipidveränderungen nach pränatalen Diagnosen von Sphingolipidosen in den Geweben der erhaltenen Feten wurden in einigen Fällen beschrieben (O'Brien et al., 1971; Schneider et al., 1972; Ellis et al., 1973; Leroy et al., 1973; Percy et al., 1973; Schneck et al., 1975).

In dieser Studie sollen die pathologischen Lipidgehalte in den Organen von vier weiteren, teils etwas anders gelagerten Fällen pränataler Sphingolipid-Stoffwechselstörungen (je ein Fet mit GM_2-Gangliosidose Typ 2, metachromatischer Leukodystrophie, globoidzelliger Leukodystrophie und M. Niemann-Pick Typ C) quantitativ zu er-

+die Literaturstellen betreffen Übersichtsarbeiten, in denen die jeweiligen Erstbeschreiber genannt sind.

fassen versucht werden. Alle Feten stammen aus Familien, in denen schon ein Kind mit der jeweiligen Krankheit vorgekommen war, und die deshalb von der Möglichkeit der pränatalen Diagnose Gebrauch machten. Nach der Diagnose des Stoffwechseldefekts (Harzer et al., 1975a, 1975b, 1976 und in Vorbereitung) wurden die Schwangerschaften durch einen Prostaglandin-induzierten Abort beendet.

MATERIAL UND METHODIK

Das verwendete fetale Material war tiefgefroren bei -20 °C bis zu 1 1/2 Jahre aufbewahrt worden. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die untersuchten Feten. Aus den zu untersuchenden Organen (Gehirn, Leber, Niere) wurden Homogenate (10 % g:v) mit Wasser/Methanol 1:1 (v:v) hergestellt. Um die gesuchten Lipidwerte (s. unten) auf Trockengewicht beziehen zu können, wurde von jedem Homogenat eine definierte Menge gefriergetrocknet und gewogen. Für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen kamen zwischen 2 und 200 µl der Homogenate oder (für Ganglioside, Asialo-Gangliosid, sowie Lactosyl-Sulfatid in der Leber) von Extrakten der Trokkenrückstände (1 % g:v, in Chloroform/Methanol 2:1, v:v; Extraktionszeit 1 x 30 und 2 x 5 Min. bei 22 °C) auf Kieselgelplatten (Merck Art.Nr. 5721) an der Startstelle strichförmig (15 mm lang) aufgetragen, zur Anwendung. Als Vergleichssubstanzen wurden neben die Proben zwischen 2 und 20 µg folgender Lipide ebenfalls strichförmig aufgetragen: Cholesterin (Serva,,Heidelberg), Sulfatide (Applied Sciences/Serva), Ganglioside (Geamtfraktion: Koch-Light, Buckinghamshire, England; Gangliosid GM_2: Supelco/Bureau Hahn, Düsseldorf), Lecithin, Kephalin (präpariert nach Harzer et al., 1967), Sphingomyelin (Roth, Karlsruhe). Das Asialo-Derivat von Gangliosid GM_2 wurde freundlichst von Dr.

K. Sandhoff (München) überlassen. Die Platten wurden mit Chloroform/Methanol/Wasser (C/M/W) 14:6:1 (v:v:v) 2mal bis zur Steighöhe von ca. 3 cm vorchromatographiert und jeweils getrocknet. Durch diesen Vorgang wurde eine vollständige Extraktion der Lipide aus den Startstellen und gleichzeitige Schärfung dieser Stellen erzielt. Die endgültige Auftrennung der Lipide (Steighöhe ca. 15 cm) erfolgte entweder in dem genannten Fließmittel (für Ganglioside zwei Läufe) oder (für Cholesterin) in reinem Chloroform. Danach wurden die Platten mit Kägi-Miescher-Reagenz (Eisessig/Schwefelsäure/Anisaldehyd 100:2:1, v:v:v; zitiert bei Stahl und Kaltenbach, 1961) besprüht, 15 Min. bei 120 °C erhitzt und sofort bei einer Wellenlänge von 600 nm in Remission densitometriert (Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometer). Die durch die Substanzflecken bedingte Absorptionsänderung wurde registriert, die Flächen unter den zu den einzelnen Substanzen gehörigen Peaks wurden ausgeschnitten und gewogen. Über die Papiergewichte wurden die Lipidmengen bestimmt (Harzer et al., 1968). Am Beispiel der Lecithin-Bestimmung in der Leber von Fet 1 soll das Vorgehen dargestellt werden: Auf einer Platte wurden nebeneinander aufgetragen: 2.5 µg Test-Lecithin, 5 µg Test-Lecithin, 10 µl fetales Leberhomogenat 10 % (g:v, bezogen auf Feuchtgewicht), 10 µg Test-Lecithin, 15 µl fetales Leberhomogenat, 12.5 µg Test-Lecithin. Nach Chromatographie und Ansprühen wurden die Bahnen densitometriert (s. oben). Die den Lecithin-Flecken entsprechenden Peak-Flächen wurden ausgeschnitten und gewogen. Dabei ergaben sich folgende Gewichte (mg Registrierpapier): 7.8; 15.0; 19.5; 28.5; 30.0; 35.0. Es wurde darauf geachtet, daß die gesuchten Werte innerhalb des Bereiches der Testwerte lagen. Aus den Gewichten der 5 Testwerte und dem Nullpunkt wurde graphisch eine Eichkurve (annähernd eine Gerade) gebildet. Aus dieser ergab sich für 19.5 bzw. 30.0 mg Papiergewicht eine Lecithinmenge von 6.8 bzw. 10.6 µg. Diese

Werte entsprechen gemittelt 3.3 % vom Organtrockengewicht. Nach Dreifachbestimmung auf verschiedenen Platten ergab sich schließlich ein Mittelwert von 3.8 % (Einzelwerte: 3.3; 3.9; 4.2). - Für die Bestimmung von Sphingomyelin wurde mit innerem Standard gearbeitet: Auf vier verschiedenen Bahnen einer Dünnschichtplatte wurden gleiche Mengen der Proben, und auf drei dieser Bahnen 5 bis 15 µg Sphingomyelin-Test zusätzlich aufgetragen. Die mit den Papiergewichten der Sphingomyelin-Peaks erhaltene Standard-Kurve (annähernd eine Gerade) wurde bis zur Abszisse extrapoliert und die gesuchte Lipidmenge als Abszissen-Abschnitt zwischen Schnitt- und Nullpunkt abgelesen.

Für die Säulenchromatographie wurden Gewebsstücke gefriergetrocknet und die Lipide mit dem jeweils ersten Elutionsmittel (s. unten) 2 Std. bei 22 °C extrahiert. Für alle Trennungen wurde eine Säule mit den Maßen 350 x 7 mm verwendet.
Mit dem Adsorptionsmittel Florisil (Serva; 200-300 mesh, 15 Std. bei 60 °C aktiviert) wurde der Lipidextrakt des Trockenrückstands von 1 g Gehirn des Kontrollfeten säulenchromatographisch aufgetrennt. Die Elutionsmittel waren: je 20 ml C/M 19:1, 17:3, 3:1, 2:1; dann C/M/W 66:33:1; daraufhin wurde der Wasseranteil in 1-ml-Schritten bis auf 66:33:6 erhöht; schließlich folgten je 10 ml C/M/W 5:5:1, 10:10:3, 2:3:1, 3:7:3; sowie C/M/W/conc. Ammoniaklösung 6:15:4:2. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug am Anfang der Elution 0.3 ml/Min., am Ende 0.03 ml/Min.. Es wurden 150 Fraktionen zu je 1 ml geschnitten, die isolierten Lipide mittels Test-Substanzen dünnschichtchromatographisch identifiziert, lipidhaltige Fraktionen vereinigt, getrocknet und gewogen.
Die Sulfatide aus fetalem Nierengewebe wurden wiederum an aktiviertem Florisil aus dem Lipidextrakt von 0.5 g Gewebe abgetrennt. Elutionsmittel war C/M 2:1, die

Durchflußgeschwindigkeit 0.3 ml/Min., das Fraktionsvolumen 5 ml. Die Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf ihren Sulfatid-Gehalt geprüft. Die Sulfatid-Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch in Galaktosyl-Sulfatide (Ceramid-Galaktose-3-Sulfate, "Gal-Sulf") und Lactosyl-Sulfatide (enthalten zwischen Ceramid und dem Galaktosyl-Rest noch einen Glucosyl-Rest, "Lact-Sulf") aufgetrennt (Abb. 4) und die Mengen von Gal-Sulf und Lact-Sulf densitometrisch bestimmt. Als Vergleichssubstanzen dienten authentische (Harzer und Benz, 1974), aus der Niere eines Kindes mit metachromatischer Leukodystrophie isolierte Sulfatide.

Um das Monohexosyl-Diglycerid ("Substanz X", s. Ergebnisse) vorläufig zu charakterisieren, wurde die Substanz X mit den Laufmitteln C/M/W 14:6:1 und reinem Chloroform mit käuflichem Galaktosyl-Diglycerid (Serva) dünnschichtchromatographiert. Die R_F-Werte beider Substanzen lagen ähnlich (geringere Unterschiede dürften auf die pflanzliche Herkunft der Vergleichssubstanz zurückzuführen sein), die Anfärbbarkeit mit dem Kägi-Miescher-Reagenz (s. oben), welches relativ substanz- bzw. gruppenspezifisch reagiert, war gleich.
Nach Hydrolyse mit 6 N Salzsäure (18 Std., 60 °C) wurde aus der Substanz Hexose freigesetzt, die ebenfalls dünnschichtchromatographisch charakterisiert wurde. Eine genauere Charakterisierung und Quantifizierung des Hexosyl-Diglycerids in fetalen Geweben war wegen Materialmangel nicht möglich.

Die Untersuchung auf Metachromasie (s. Diskussion) in der Lipidfraktion der Organe des Feten mit metachromatischer Leukodystrophie (Fet 2,s. Tab. 1) geschah folgendermaßen: Zum getrockneten Lipidextrakt aus Organ-Trockenrückstand (s. oben) von je 5 mg Gewebe wurden 0.5 ml einer Lösung von Diäthyl-Pseudoisocyaninchlorid (Serva Nr. 33800) in Wasser (0.01%, g:v) und 0.05 ml

einer 1%igen wässrigen Lösung von Natriumcholat (Roth) gegeben und nach einstündigem Stehenlassen bei 22 °C ein Teilspektrum zwischen 530 und 630 nm gemessen (vgl. Appel und Scheibe, 1958; Harzer und Benz, 1973).

ERGEBNISSE

Alle hier aufgeführten Lipidwerte, mit Ausnahme derjenigen für Gehirn des Kontrollfeten (Tab. 2), basieren auf densitometrischen Messungen. Es sind Mittelwerte von Zwei- bis Vierfach-Bestimmungen, deren größte und kleinste Werte sich um 1.5 bis höchstens 19 % vom Mittelwert unterschieden, je nach Art und Menge des untersuchten Lipids.
Im folgenden werden die Lipidwerte für jeden untersuchten Feten (vgl. Tab. 1) einzeln aufgeführt, da bei jeder fetalen Sphingolipidose nur bestimmte Lipidwerte interessant sind.

Fet 1: Kontrolle

Aus Tabelle 2 geht die Lipidzusammensetzung von Hirn-, Leber- und Nierengewebe des Kontrollfeten hervor. Die Werte für Gehirn wurden gravimetrisch (Einfachbestimmungen wegen Materialmangel) und teilweise densitometrisch (vgl. Abb. 1), die Werte für Leber und Niere ausschließlich densitometrisch erhalten. Für das Fehlen nachweisbarer Mengen der Hirnmarksubstanz-typischen Lipide Galaktocerebrosid und Sulfatid vergleiche Svennerholm und Vanier (1972), sowie Diskussion.

Fet 2: Metachromatische Leukodystrophie

Abbildung 2 zeigt im Gehirn von Fet 2 einen leicht erhöhten Gehalt von metachromatischem Material (s. Methodik und Diskussion), welches bisher nicht näher identifiziert werden konnte, da weder dünnschicht- noch säulenchromatographisch Sulfatide sicher nachweisbar waren. Abbildung 3 zeigt deutlich vermehrt metachromatisches

Material in der Niere von Fet 2. Dünnschichtchromatographisch konnten hier (Abb. 4), sowie in der Leber des Feten, Sulfatide identifiziert werden. Die nach Säulen- und Dünnschichtchromatographie (s. Methodik) erhaltenen Sulfatidwerte zeigt Tabelle 3.

Fet 3: GM_2-Gangliosidose Typ 2 (M. Sandhoff)
In dem Gehirn des Feten konnte eine deutliche Vermehrung der Gesamt-Ganglioside, insbesondere ein stark gesteigerter Gehalt an Gangliosid GM_2 nachgewiesen werden. Auch das Asialoderivat von diesem Gangliosid (Sandhoff et al., 1971) wurde in pathologischer Menge gefunden, Zahlenwerte für die einzelnen Ganglioside sind der Tabelle 4 zu entnehmen, vergleiche im übrigen Abbildung 5. Die Zusammensetzung der einzelnen Gangliosid-Typen ist aus dem Schema auf S. 35 ersichtlich.

Fet 4: M. Niemann-Pick Typ C
In der Leber des Feten ist eine Vermehrung von Sphingomyelin, Cholesterin und "Substanz X" (Hexosyl-Diglycerid, vgl. Methodik) nachweisbar; Werte siehe Tabelle 5. Die zunächst nicht signifikant erscheinende Erhöhung des Sphingomyelin-Gehalts in der Niere (Faktor ca. 1.2 nach Tab. 5) wird im Vergleich zur Kontrolle deutlicher, wenn die Sphingomyelin/Lecithin- oder Sphingomyelin/Kephalin-Quotienten gebildet werden. Dies entspricht einer abnormen Verteilung der Phospholipide in der Niere von Fet 4 zu Gunsten von Sphingomyelin, ein Effekt, der auch für die Werte in der Leber errechenbar ist. Vergleiche Abbildung 6.

Fet 5: Globoidzellige Leukodystrophie (M. Krabbe)
Es konnte in keinem der untersuchten Organe eine signifikante Veränderung des Lipidmusters gefunden werden, mit Ausnahme des geringen Gehalts an "Substanz X" (Hexosyl-Diglycerid) in der Leber (vgl. Abb. 6). Die physiologische Variation des Gehalts dieses Lipids ist jedoch noch nicht untersucht.

DISKUSSION

Werden Stoffwechselkrankheiten pränatal diagnostiziert, so sollte sich der Untersuchungsgang nicht darin erschöpfen, den Stoffwechseldefekt - d.h. fast immer: den genetisch bedingten Enzymdefekt - im Amnionzellmaterial und in den fetalen Geweben zu verifizieren. Es erscheint in jedem Fall einer pränatal gesicherten Stoffwechselerkrankung mit nachfolgender Interruptio wichtig, auch nach den Auswirkungen der Enzymdefekte, die bereits beim Feten erwartet werden können, zu suchen, um einen Einblick in die Krankheitsentwicklung während des intrauterinen Stadiums zu bekommen. In dieser Arbeit geht es um Lipiduntersuchungen an Feten mit Sphingolipidosen (SL). Die typischen Formen der SL sind Lipidspeicherkrankheiten, bei denen vor allem ein Sphingolipid stark vermehrt ist (andere Sphingolipide sind geringergradig vermehrt oder auch vermindert), weil das für seinen Abbau zuständige Enzym, meist eine Lipid-Hydrolase, defekt ist, die Lipid-Biosynthese jedoch wenig gestört ist. Die Sphingolipide sind aus Ceramid und verschiedenen hydrophilen Anteilen (meist Zucker) zusammengesetzt; die genannten Enzyme spalten meist einen dieser hydrophilen Anteile ab. Die pränatal gefundenen Sphingolipid-Speicherungen bei den SL sprechen dafür, daß schon zu diesem Stadium ein Sphingolipid-Turnover stattfindet. Auf das pathogenetisch aufschlußreiche, morphologische bzw. ultrastrukturelle Korrelat der SL soll hier nicht eingegangen, sondern nur auf folgende Arbeiten hingewiesen werden: Die GM_2-Gangliosidose Typ 1 (Tay-Sachs' sche Krankheit) wurde von O'Brien (1973) und Lowden et al. (1975), die metachromatische Leukodystrophie von Maier und Bischoff (1976), der klassische Typ A der Niemann-Pick'schen Krankheit (Sphingomyelinose) von Schneider et al. (1972) und der M. Krabbe (Globoidzellige Leukodystrophie) von Ellis et al. (1973) morpho-

logisch im pränatalen Stadium untersucht. Dabei sind die ultrastrukturellen Veränderungen nicht immer im fetalen Zentralnervensystem am stärksten, obwohl die SL postnatal meist in erster Linie als neurodegenerative Erkrankungen imponieren.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Lipidvermehrungen bei pränatalen SL zu quantifizieren. Als Material lagen tiefgefrorene Gewebe von den eingangs aufgelisteten Feten (vier mit SL, ein Kontrollfet; vgl. Tab. 1) vor. Die Art der SL bei den pathologischen Feten war bereits bekannt und an den Feten enzymatisch betätigt worden (s. Einleitung). Lipidanalysen der Feten standen jedoch noch aus.

Die dünnschichtchromatographische Identifikation der zu den einzelnen SL gehörenden Haupt-Speicherlipide (Tab. 1) bereitete kaum größere Schwierigkeiten, da die fraglichen Lipide entweder als käufliche Testsubstanzen vorlagen oder aber Referenz-Organlipide von postnatal diagnostizierten Fällen mit SL vorlagen. In den Extrakten waren die Speichersubstanzen klar erkennbar.

Die benützten Lipidbestimmungsmethoden, meist also die Densitometrie nach Dünnschichtchromatographie und Anfärbereaktion, aber auch die Säulenchromatographie mit folgender Gravimetrie, oder beide Methoden kombiniert, sind nicht unproblematisch. Auf eine ausführliche Diskussion der Methoden (vgl. Harzer et al., 1968) wird hier jedoch verzichtet, sondern es werden nur einige wichtige Punkte kurz angesprochen:

1. Die Brauchbarkeit der Methoden geht daraus hervor, daß die Werte für den Lipidgehalt im normalen Feten trotz anderer Methodik durchaus mit denjenigen in der Literatur vergleichbar sind (s. Tab. 2 und 4, und z.B. Svennerholm, 1964).

2. Die Fehlerbreite der Messungen sind nicht für alle untersuchten Lipide sehr günstig. Der Fehler hängt so-

wohl von der Lipidmenge als auch von der Art des zu bestimmenden Lipids ab. Abweichungen bis zu 19% vom Mittelwert wurden in Kauf genommen, weil sie einerseits immerhin noch klein genug waren, um die pathologischen Lipidveränderungen eindeutig abzugrenzen und weil andererseits die benützten Methoden relativ einfach, schnell und materialsparend sind (dies ist bei fetalen Geweben wichtig).
3. Die Wiederfindungsrate der untersuchten Lipide betrug bei den dünnschichtchromatographischen Methoden fast 100% der aus dem Gewebe extrahierten Lipide. Die extrahierte Menge, die im allgemeinen über 95% beträgt, wurde dadurch teils erhöht, daß geeignete Gewebshomogenate (in Wasser/Methanol) direkt auf die Dünnschichtplatte aufgetragen und mehrfach auf kurzer Laufstrecke vorchromatographiert wurden, wobei eine nahezu erschöpfende Lipid-Extraktion gelang.

Im folgenden sollen nun die bei den Feten mit SL erhaltenen Lipidwerte im einzelnen, für jede Art von SL getrennt, diskutiert werden. Da alle Feten aus dem zweiten Schwangerschafts-Drittel stammten, (20.-26. Woche, Tab. 1), sind die Werte immer in Bezug auf dieses Entwicklungsstadium und das individuelle Alter der Feten zu betrachten.

1. Kontrollfet: Die in Tabelle 2 wiedergegebenen Lipidwerte des Feten stimmen mit der Literatur relativ gut überein. Gegenüber den Angaben von Svennerholm (1964) weichen die Werte für Lecithin umd Kephalin, gegenüber jenen von Roux et al. (1971) die Cholesterinwerte etwas ab. Serin-Kephalin (vgl. Svennerholm und Vanier, 1972) konnte mit unseren Methoden nicht sicher identifiziert werden. Auf das Vorkommen von Monohexosyl-Diglycerid - die Substanz wurde allerdings erst vorläufig identifiziert - im fetalen Gehirn wird

hingewiesen. Im Gegensatz zu Ellis et al. (1973) und Leroy et al. (1973), jedoch übereinstimmend mit Svennerholm und Vanier (1972) konnten im Fetalhirn keine quantifizierbaren Mengen von Galaktocerebrosid (s. unten) gefunden werden.

2. Fet mit metachromatischer Leukodystrophie (MLD): Die MLD ist eine durch Lipidspeicherung bedingte Entmarkungskrankheit des Nervensystems. Die gespeicherten Lipide sind Sulfatide, also im Zuckeranteil mit Schwefelsäure veresterte Glykosphingolipide; der Enzymdefekt betrifft das Sulfat-abspaltende Enzym (s. Tab. 1). Die Sulfatide vom Galaktose-Sulfat-Typ (s. Methodik) sind ein wichtiger Bestandteil der Marksubstanz (Myelinscheiden) der Nervenleitungsbahnen. Im zweiten Schwangerschafts-Drittel sind die Leitungsbahnen noch nicht oder kaum bemarkt, es verwundert also nicht, daß bei MLD in dieser Zeit noch keine Sulfatide im Nervensystem angehäuft sind. Die von Harzer et al. (1975a) beschriebenen Sulfatidvermehrungen im Gehirn des hier weiter untersuchten MLD-Feten (21. Schwangerschaftswoche) trifft nicht zu, sondern die Angabe beruht auf einem Identifikationsfehler: Eine in geringer Konzentration vorkommende Substanz mit annähernd demselben dünnschichtchromatographischen Verhalten wie dasjenige der Sulfatide wurde wohl mit diesen verwechselt.+ Die von Harzer et al. (1975a) mitgeteilte Vermehrung "metachromatischen Materials" im Gehirn des MLD-Feten konnte jedoch weitgehend bestätigt werden. Abbildung 2 zeigt, daß die Lipid-Extrakte der Gehirne der einzelnen Feten verschiedene Teilspektren der Lichtabsorption ergeben, wenn man sie mit einem metachromatischen Farbstoff und Detergenz in wässriger Lösung suspendiert. (Metachromasie heißt, daß an einem Polyanion - z.B. an einer Micelle aus sauren Lipidmolekülen - sich ein kationischer Farbstoff so anordnet

+erneute Nachuntersuchung nach Fertigstellung dieser Arbeit spricht jedoch wiederum für eine leichte Sulfatid-Vermehrung. Das Problem wird mit einer anderen Methode weiter bearbeitet.

daß er dabei seine Lichtabsorption ändert). Der in Abbildung 2 der Lichtabsorptionsänderung bzw. Metachromasie entsprechende Peak liegt bei ca. 570 bis 580 nm und ist für den MLD-Feten am höchsten, wenn auch in den anderen fetalen Hirnextrakten die Peaks nachweisbar sind. Welche metachromatischen Substanzen diese Peaks erzeugen, konnte nicht geklärt werden. Sulfatide sind es wahrscheinlich nicht, vielleicht jedoch biochemische Vorstufen derselben. Es sei im übrigen betont, daß auch andere saure Lipide, wie z.B. Inosit-Phosphatide, metachromatisch reagieren und im Gehirn vorkommen. Die von Leroy et al. (1973) berichtete Sulfatid-Anhäufung im Gehirn eines MLD-Feten ist eventuell mit dessen Alter von 26 Wochen zu erklären. Wenn die spezifischen Lipidveränderungen im Gehirn des MLD-Feten wenig eindrucksvoll waren, so traf das Gegenteil für die fetale Niere zu. Die Niere ist ja bei postnataler MLD stark an dem Lipidspeicherprozeß beteiligt; wahrscheinlich haben die Sulfatide eine nierenspezifische Funktion. Die Abbildung 4 zeigt einen sehr starken Unterschied zwischen den Mengen der säulenchromatographisch aus der fetalen Niere dargestellten Sulfatid-Fraktionen von MLD- und Kontroll-Fet. Wie von den Sulfatiden der Niere bekannt ist (Martensson et al. 1966; Harzer and Benz, 1974) treten diese Substanzen, vor allem bei der MLD, in mindestens vier Fraktionen auf. Es handelt sich um Substanzen vom Galaktose-Sulfat- und vom Lactose-Sulfat-Typ, wobei jeder Typ noch als Nichthydroxy- und Hydroxy-Fettsäure-Verbindung auftritt. In der Arbeit von Meier und Bischoff (1976) wird darauf hingewiesen, daß die Sulfatide vom Lactose-Sulfat-Typ in der fetalen MLD-Niere vorkommen, dies ist analog zu den postnatalen Verhältnissen bei der Erkrankung zu erwarten und in der Abbildung 4 zu sehen. Der Anteil der Sulfatide vom Lactose-Sulfat-Typ an den Gesamt-Sulfatiden ist möglicherweise im

fetalen Stadium der MLD etwas höher als im postnatalen Stadium: In der fetalen MLD-Niere beträgt der Anteil 25 %, in der postnatalen MLD-Niere 10 bis 22 % (Harzer and Benz, 1974; Martensson et al., 1969; vgl. Tab. 3). Entsprechend zu dem hohen Sulfatidgehalt in der fetalen MLD-Niere ist das zugehörige Teilspektrum für Metachromasie (s. oben) deutlich von den Absorptionskurven, die für den Kontrollfeten erhalten wurden, verschieden, mit hoher Absorption in der Gegend von 580 nm (Abb. 2).

3. Fet mit GM_2-Gangliosidose Typ 2 (M. Sandhoff): Ganglioside (vgl. S. 35) sind Zucker- und Neuraminsäure-haltige typische Lipide des Neuropils. Sie häufen sich bei genetischem Defekt bestimmter Galaktosidasen oder Galaktosaminidasen pathologisch an. - Die Speicherung von Gangliosid GM_2 im Gehirn des untersuchten Feten (Tab. 4) scheint, soweit eine Umrechnung nach den Literaturangaben möglich ist, vergleichbar oder höhergradig zu sein als jene bei fetaler GM_2-Gangliosidose Typ 1 ("M. Tay-Sachs"; O'Brien et al., 1971; Percy et al., 1973; Schneck et al., 1975). In Ergänzung zu der Originalarbeit über den hier untersuchten Feten (Harzer et al., 1975b) konnte der Wert für Gangliosid GM_2 genauer gemessen und das Asialoderivat dieses Gangliosids (Sandhoff et al., 1971; Schneck et al., 1975) nachgewiesen werden. Für den fetalen M. Sandhoff liegen aus der Literatur bisher keine Vergleichswerte dieser Lipide des Gehirns vor. Nach Tabelle 4 wird die Vermehrung der Gesamt-Ganglioside bei dem Feten zwar vorwiegend durch das gespeicherte Gangliosid GM_2, jedoch auch durch GM_1 hervorgerufen - Verhältnisse, die postnatal bei M. Sandhoff nicht anzutreffen sind. Falls sie nicht auf unkontrollierten Schwankungen beruhen, könnte der Befund bedeuten, daß vermehrt vorliegendes GM_2 im pränatalen Stadium zur gesteigerten Biosynthese des höheren Gangliosids GM_1 führt, als dessen Vorstufe GM_2

anzusehen ist. - Globosid (s. Sandhoff et al., 1971) konnte in der Niere des Feten bisher nicht nachgewiesen werden; die zu erwartende Menge dieses weiteren Speicherlipids bei M. Sandhoff dürfte unter der Nachweisgrenze der benützten Methoden liegen.

4. Fet mit M. Niemann-Pick Typ C (NPC): Der NPC ist eine klinisch und biochemisch schwierig zu definierende neuroviscerale Speicherkrankheit. Der zu Grunde liegende Enzymdefekt ist bisher nicht eindeutig (vgl. Callahan et al., 1975) bekannt. Morphologisch erscheint die Lipidose evident, biochemisch kann sie jedoch nur in der postnatalen Milz (allenfalls noch in Leber und Niere) verifiziert werden (Philippart et al., 1969; Harzer et al., in Vorbereitung). An dem hier untersuchten, ersten pränatalen Fall von NPC konnte die Lipidvermehrung in der fetalen Leber gut objektiviert werden. Das Sphingolipid Sphingomyelin, sowie Cholesterin und Hexosyl-Diglycerid (vorläufig identifiziert) sind etwa gleich stark, um Faktoren zwischen 2 und 3, vermehrt (Tab. 5). Es liegen also andere Verhältnisse als bei der klassischen Form des M. Niemann-Pick, dem Typ A, vor, der durch eine deutlich stärkere Sphingomyelin-Vermehrung und den entsprechenden Defekt des Sphingomyelin-abbauenden Enzyms gekennzeichnet ist (Schneider et al., 1972). Die etwa gleichgradige Akkumulierung mehrer Lipide bei NPC mag auf einer komplexen genetischen Störung beruhen - vielleicht auf einer Membranstörung, die zu einem "stöchiometrisch falschen" Lipideinbau in die Membran (fehlerhafte Protein-Matrix?) führt. Dazu würde eventuell der Befund in der Niere des NPC-Feten passen, in der die Lipidveränderungen weniger als Vermehrungen erscheinen, sondern als Verteilungsstörung der Phospholipide (s. Ergebnisse) aufgefaßt werden können. Obwohl der untersuchte Fet bereits in

utero verdachtsweise als mit NPC behaftet diagnostiziert wurde und diese Diagnose an der fetalen Leber lipidchemisch betätigt werden konnte, ist doch die pränatale Diagnose des NPC nicht mit Sicherheit möglich und gelang hier wohl nur durch die Mithilfe des Zufalls. Es wurde zwar eine Teilerniedrigung des Enzyms Sphingomyelinase in der Amnionzellkultur nachgewiesen (Harzer et al., in Vorbereitung), inwieweit dieser Befund jedoch mit Sicherheit für NPC spricht (vgl. Callahan et al., 1975), ist noch unklar.

5. Fet mit M. Krabbe (Globoidzellige Leukodystrophie): Der M. Krabbe ist eine schwere Entmarkungskrankheit des Gehirns, die durch den genetischen Defekt desjenigen Enzyms, welches das Sphingolipid Galaktocerebrosid abbaut, bedingt ist (Suzuki and Suzuki, 1970). In den Organen des untersuchten Feten konnten bei mehreren Versuchen keine pathologischen Lipidveränderungen festgestellt werden (vgl. Ellis et al., 1973). Dies ist in Anbetracht der postnatalen Lipidveränderungen bei der Erkrankung nicht verwunderlich. Die Veränderungen bestehen in einer Verminderung der für die Marksubstanz des Nervengewebes typischen Lipide, wobei das Galaktocerebrosid als "Leitlipid" der Marksubstanz scheinbar relativ verschont bleibt. In Wirklichkeit wird es wohl in entgegengesetzter Richtung zu dem Prozeß des Marklipid-Verlustes etwas angehäuft, jedoch nicht so stark, daß der absolute Gehalt erhöht wäre. Da zu dem untersuchten pränatalen Zeitpunkt praktisch keine Bemarkung des fetalen Gehirns und damit keine meßbaren Mengen an Marklipiden (Galaktocerebrosid und Sulfatid, vgl. Svennerholm and Vanier, 1972) zu erwarten waren, zeigten sich auch keine entsprechenden Lipidveränderungen bei dem pathologischen Feten. Enzymatisch und morphologisch (Globoidzellen im Rücken-

mark) war dieser einwandfrei als mit M. Krabbe affiziert erkannt worden (Harzer et al., 1976).

Abschließend ist zu sagen, daß drei der vier pathologischen Feten mit verschiedenen Sphingolipid-Stoffwechselstörungen schon im zweiten Schwangerschaftsdrittel bei der Lipidanalyse deutliche Veränderungen zeigten, analog zu jenen, die man von den Erkrankungen im postnatalen Stadium kennt. Der durch die Enzymopathie ablaufende Krankheitsprozeß ist bereits in vollem Gang, und eine in Zukunft vielleicht mögliche Therapie muß die intrauterinen pathologischen Veränderungen unbedingt berücksichtigen. Die im fetalen Stadium teils etwas anderen Akzentuierungen der Lipidanhäufungen im Vergleich zum postnatalen Stadium sind wohl durch den speziellen Ablauf der Organogenese zu erklären. Für den auf dem Gebiet der Sphingolipidosen tätigen Biochemiker ist es trotzdem interessant, daß z.B. die pränatale metachromatische Leukodystrophie im wesentlichen als Lipidspeicherung der Niere erscheint und von der postnatal ausschlaggebenden Gehirnbeteiligung noch nichts zu bemerken ist. Ähnliches gilt für das pränatale Stadium des M. Niemann-Pick Typ C, das den Schwerpunkt der Lipidspeicherung in der Leber zeigt, während im postnatalen Stadium der Schwerpunkt in der pathologisch vergrößerten Milz liegt, wobei klinisch auch bei dieser Erkrankung die Gehirnbeteiligung im Vordergrund steht.

DANKSAGUNGEN

Folgenden Kollegen sei für die Vermittlung bzw. Überlassung des fetalen Materials gedankt:
Dr. J. Gehler (Universitätskinderklinik Kiel),
Dr. W. Jonatha (Universitätsfrauenklinik Ulm),
Prof. Dr. K. Knörr (Universitätsfrauenklinik Ulm),
Dr. M. Müller (Universitätskinderklinik Tübingen),
Dr. Ortlieb (II. Kinderklinik Augsburg),
Dr. Schumann (Universitätsfrauenklinik Hamburg-Eppendorf),
Dr. S. Stengel-Rutkowski (Universitätskinderpoliklinik München),
Dr. Walther (Kinderabteilung des Kreiskrankenhauses Reutlingen) und
Dr. V. Zahn (II. Universitätsfrauenklinik München).

ZUSAMMENFASSUNG

An vier Feten aus der 20. - 26. Schwangerschaftswoche mit verschiedenen, pränatal diagnostizierten Sphingolipid-Stoffwechselstörungen (Fet 1, Kontrolle; Fet 2, metachromatische Leukodystrophie; Fet 3, GM_2-Gangliosidose Typ 2; Fet 4, M. Niemann-Pick Typ C und Fet 5, globoidzellige Leukodystrophie) wurden die Lipidveränderungen (meist Lipidvermehrungen) säulenchromatographisch und dünnschichtchromatographisch-densitometrisch quantifiziert und mit den Werten eines Kontrollfeten verglichen.

Die wichtigsten Befunde waren: Fet 2: Speicherung von Galaktosyl- und Lactosyl-Sulfatid in der Niere (und teils Leber); Vermehrung von metachromatischem Material (Sulfatid-Identität bisher nicht nachgewiesen) im Gehirn. Fet 3: Speicherung von Gangliosid GM_2 und zugehörigem Asialoderivat im Gehirn. Fet 4: Vermehrung von Sphingomyelin, Cholesterin und Hexosyl-Diglycerid (vorläufig charakterisiert) in der Leber, ferner in Niere und Leber "Phospholipid-Verteilungsstörung" mit Verminderung von Lecithin und Kephalin bei vermehrtem Sphingomyelin. Fet 5: Keine Anhäufung von Galaktocerebrosid im Gehirn.

Die Lipidspeichermuster sind nicht nur quantitativ, sondern teils auch qualitativ von den postnatalen Verhältnissen bei den Sphingolipidosen verschieden.

LITERATUR

APPEL, W. und G. SCHEIBE: Über die Bildung reversibler Polymerisate des Pseudoisocyanins durch polare, kettenförmige Hochpolymere (Heparin).
Z. Naturforsch. 13b, 359 - 364 (1958)

CALLAHAN, J.W., M. KHALIL and M. PHILIPPART: Sphingomyelinases in human tissues. II. Absence of a specific enzyme from liver and brain of Niemann-Pick disease, type C.
Pediat. Res. 9, 908 - 913 (1975)

ELLIS, W.G., E.L. SCHNEIDER, J.R. McCULLOCH, K. SUZUKI and C.J. EPSTEIN: Fetal globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease). Pathological and biochemical examination.
Arch. Neurol. 29, 253 - 257 (1973)

FREDRICKSON, D.S. and H.R. SLOAN: Sphingomyelin lipidoses: Niemann-Pick disease. In: STANBURY, J.B., J.B. WYNGAARDEN and D.S. FREDRICKSON (ed.): The metabolic Basis of inherited disease (McGraw-Hill, Blakiston Div.: New York, 3rd edit. 1972) p. 783 - 807

HARZER, K. und H.U. BENZ: Quantitative Metachromasie mit Pseudoisocyanin: Eine neue Methode zur Bestimmung von Sulfatiden sowie ihre Anwendung bei der Diagnose der Metachromatischen Leukodystrophie (Sulfatid-Lipidose).
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11, 471 - 475 (1973)

HARZER, K. and H.U. BENZ: Deficiency of lactosyl sulfatide sulfatase in metachromatic leukodystrophy (sulfatidosis).

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 744 - 748 (1974)

HARZER, K., K., SANDHOFF und H. JATZKEWITZ: Säulenchromatographische Darstellung von Phosphatiden aus Gehirn-Gesamtlipoidextrakt.
Z. Physiol. Chem. 348, 119 - 120 (1967)

HARZER, K., W. WÄSSLE, K. SANDHOFF und H. JATZKEWITZ: Densitometrische Mikrobestimmung von Lipiden nach Dünnschicht-Chromatographie des Gesamtlipidextrakts.
Z. Anal. Chem. 243, 527 - 536 (1968)

HARZER, K., V. ZAHN, S. STENGEL-RUTKOWSKI und E.-O. GLEY: Pränatale Diagnose der metachromatischen Leukodystrophie.
Dtsch. med. Wschr. 100, 951 - 953 (1975a)

HARZER, K. J. PEIFFER, W. SCHLOTE und H.U. BENZ: Morbus Niemann-Pick Typ C. Morphologie sowie Lipid- und Sphingomyelinase-Muster eines pränatalen und eines postnatalen Falls.
Neuropädiatrie, in Vorbereitung

HARZER, K., H.U. BENZ, H. KNÖRR-GÄRTNER, W.D. JONATHA und K. KNÖRR: Pränatale Diagnose der Globoidzell-Leukodystrophie (Morbus Krabbe).
Dtsch. med. Wschr. 101, 821 - 824 (1976)

HARZER, K., S. STENGEL-RUTKOWSKI, E.-O. GLEY, J.-D. MURKEN, V. ZAHN und K.P. HENKEL: Pränatale Diagnose der GM_2-Gangliosidose Typ 2 ("Sandhoff-Jatzkewitz-Krankheit").
Dtsch. med. Wschr. 100, 106 - 108 (1975b)

LEROY, J.G., A.F. VAN ELSEN, J.-J. MARTIN, J.E. DUMON, A.E. HULET, S. OKADA and C. NAVARRO: Infantile metachromatic leukodystrophy. Confirmation of a prenatal

diagnosis.
New Engl. J. Med. 288, 1365 - 1369 (1973)

LOWDEN, J.A., N. RUDD, E. CUTZ and T.A. DORAN: Antenatal diagnosis of sphingolipid and mucopolysaccharide storage diseases.
Can. Med. Assoc. J. 113, 507 - 511 (1975)

MARTENSSON, E., A. PERCY and L. SVENNERHOLM: Kidney glycolipids in late infantile metachromatic leucodystrophy.
Acta Paediat. Scan. 55, 1 - 9 (1966)

MEIER, C. and A. BISCHOFF: Sequence of morphological alterations in the nervous system of metachromatic leucodystrophy. Light- and electronmicroscopic observations in the central and peripheral nervous system in in a prenatally diagnosed foetus of 22-weeks.
Acta neuropath. 36, 369 - 379 (1976)

MOSER, H.W.: Sulfatide lipidosis: Metachromatic leucodystrophy. In: STANBURY, J.B., J.B. WYNGAARDEN and D.S. FREDRICKSON (ed.): The metabolic basis of inherited disease (McGraw-Hill, Blakiston Div.: New York, 3rd edit. 1972) p. 688 - 729

O'BRIEN, J.S.: Tay-Sachs disease: From enzyme to prevention.
Federation Proc. 32, 191 - 199 (1973)

O'BRIEN, J.S., S. OKADA, D.L. FILLERUP, M.L. VEATH, B. ADORNATO, P.H. BRENNER and J.G. LEROY: Tay-Sachs disease: Prenatal diagnosis.
Science 172, 61 - 64 (1971)

PERCY, A.K., K. MILLER, M. SONNEBORN and M.KABACK: Confirmatory studies in the prenatal diagnosis of sphingolipidosis.
Pediat. Res. 7, 812 - 817 (1973)

PHILIPPART, M., L. MARTIN, J.-J. MARTIN and J.H. MENKES: Niemann-Pick disease: Morphologic and biochemical studies in the visceral form with late central nervous system involvment (Crocker's group C).
Arch. Neurol. 20, 227 - 238 (1969)

ROUX, J.F., Y. TAKEDA and A. GRIGORIAN: Lipid concentration in human fetal tissue during development.
Pediatrics 48, 540 - 546 (1971)

SANDHOFF, K., K. HARZER, W. WÄSSLE and H. JATZKEWITZ: Enzyme alterations and lipid storage in three variants of Tay-Sachs disease.
J. Neurochem. 18, 2469 - 2489 (1971)

SCHNECK, L., B. PINKETT and B.W. VOLK: Asialo GM_2-ganglioside in brain fetal Tay-Sachs disease.
J. Neurochem. 24, 183 - 184 (1975)

SCHNEIDER, E.L., W.G. ELLIS, R.O. BRADY, J.R. McCULLOCH and C.J. EPSTEIN: Prenatal Niemann-Pick disease: Biochemical and histologic examination of a 19-gestational week fetus.
Pediat. Res. 6, 720 - 729 (1972)

SLOAN, H.R. and D.S. FREDRICKSON: GM_2 gangliosidosis: Tay-Sachs disease. In: STANBURY, J.B., J.B. WYNGAARDEN and D.S. FREDRICKSON (ed.): The metabolic basis of inherited disease (McGraw-Hill, Blakiston Div.: New York, 3rd edit. 1972) p. 615 - 638

STAHL, E. und U. KALTENBACH: Dünnschicht-Chromatographie. VI. Mitteilung: Spurenanalyse von Zuckergemischen auf Kieselgur G-Schichten.
J. Chromatog. 5, 351 - 355 (1961)

SUZUKI, K. and Y. SUZUKI: Globoid cell leukodystrophy (Krabbe's disease): Deficiency of galactocerebroside ß-galactosidase.
Proc. nat. Acad. Sci. 66, 302 - 309 (1970)

SUZUKI, K. and Y. SUZUKI: Galactosyl ceramide lipidosis: Globoid cell leucodystrophy (Krabbe's disease). In: STANBURY, J.B., J.B. WYNGAARDEN and D.S. FREDRICKSON (ed.): The metabolic basis of inherited disease (McGraw-Hill, Blakiston Div.: New York, 3rd edit. 1972) p. 760 - 782

SVENNERHOLM, L.: Chromatographic separation of human brain gangliosides.
J. Neurochem. 10, 613 - 623 (1963)

SVENNERHOLM, L.: The distribution of lipids in the human nervous system. I. Analytical procedure. Lipids of foetal and newborn brain.
J. Neurochem. 11, 839 - 853 (1964)

SVENNERHOLM, L. and M.T. VANIER: The distribution of lipids in the human nervous system. II. Lipid composition of human fetal and infant brain.
Brain Res. 47, 457 - 468 (1972)

Abbildung 1:

Densitogramm der Hirnlipide des Kontrollfeten (Fet 1) entsprechend 0.4mg Organtrockengewicht (s. Methodik).
Abszisse: Länge des Chromatogramms
Ordinate: Lichtabsorption bei 600 nm
Peak 1 und 2: Start und nicht identifizierte Komponenten
3: Ganglioside (vgl. Abbildung 5)
4: Sphingomyelin
5: Lecithin
6: Kephalin
7: Hexosyl-Diglycerid (?; vgl. Methodik)
8: Cholesterin und Front
Zwischen Peak 5 und 6 wären die Sulfatide, zwischen 6 und 7 die Cerebroside zu erwarten gewesen; diese Lipide waren jedoch auf sämtlichen Chromatogrammen aus Gehirn nicht nachweisbar.

Abbildung 2:

Metachromasie von Pseudoisocyanin mit Gesamtlipidfraktion (50 Mikrogramm je Einzelkurve) des fetalen Gehirns. Bei 580 nm liegt die höchste Lichtabsorption des Komplexes aus Farbstoff und metachromatisch wirksamem Material (s. Diskussion).
Kurven von oben nach unten (bei 580 nm): Ganz oben: Teilspektrum für den Feten mit metachromatischer Leukodystrophie (Fet 2; relativ stärkste Metachromasie); sodann die Kurven der Feten 1, 4, 5 und 3 (vgl. Tabelle 1).

Abbildung 3:

Wie Abbildung 2, jedoch 30 Mikrogramm Lipidfraktion aus Niere.
Drei obere Kurven (durchgezogen): Drei Ansätze für Fet 2 (metachromatische Leukodystrophie; stärkste Metachromasie). Untere Kurven (gestrichelt): Drei Ansätze für Fet 1(Kontrollfet).

Abbildung 4:

Sulfatidhaltige Fraktionen nach Säulenchromatographie des Lipidextrakts von gleichen Mengen (je 0.5 g) normaler (Fet 1) und pathologischer (metachromatische Leukodystrophie = MLD; Fet 2) fetaler Niere. Dünnschichtchromatographische Analyse zusammen mit verschiedenen Tests. a: Analyse von Fet 1; b: von Fet 2.

Bahnen 1, 5, 8, 9, 13 : Testmengen von 3, 5, 10, 15, 20 Mikrogramm Sulfatiden aus Rinderhirn (Galaktosyl-Sulfatide) auf Höhe C.

Bahnen 2, 3, 4, 6 : Säulenfraktionen von Fet 1, Bahnen 3, 4, 6 enthalten Doppelflecke von Galaktosyl-Sulfatiden auf Höhe C.

Bahnen 10 - 12 : Säulenfraktionen von Fet 2.

Bahnen 10, 11 : Galaktosyl-Sulfatide, je 2 Flecke auf Höhe C.

Bahn 12 : desgleichen, jedoch zusätzlich auf Höhe B Lactosyl-Sulfatide.

Bahnen 7, 15 : 100 bzw. 200 Mikroliter Lipidextrakt aus infantiler MLD-Niere (vgl. Tabelle 3). Höhe A: Sphingomyelin-Doppelfleck; Höhe B: Lactosyl-Sulfatid-Doppel-(oder Dreifach) Fleck; Höhe C: starker Galaktosyl-Sulfatid-Doppelfleck.

Bahn 14 : 100 Mikrogramm Sulfatide, gereinigt aus dem auf den Bahnen 7, 15 gezeigten Extrakt; B: Lactosyl-Sulfatid; C: Galaktosyl-Sulfatid.

Abbildung a, Höhe D: weniger polare Lipide.

Abbildung 5:

Ganglioside nach Dünnschicht-Chromatographie (2 Läufe, s. Methodik) der Gesamtlipide aus pathologischem und normalem Gehirn von Feten, zusammen mit Testfraktionen.

Bahn I : 30 Mikrogramm Gangliosidgemisch aus Rinderhirn.

II : Lipide aus 1 mg Gehirn (Trockengewicht) von Fet 3 mit GM_2-Gangliosidose Typ 2.

III : Wie II, jedoch von Kontrollfet (Fet 1).

IV : 100 Mikrogramm Hirnlipide eines infantilen Falles von GM_2-Gangliosidose Typ 1 (M. Tay -Sachs).

Höhe 0 - 1 : Start; Gangliosid GT_1 und GD_{1b}

2 : Gangliosid GD_{1a}

3 : Gangliosid GM_1 (auf Bahn I etwas höher, tierische Herkunft!).

4 : Gangliosid GM_2 ("Tay-Sachs-Gangliosid"; Speicherung in den Fällen der Bahnen II und IV).

5 : Lecithin

6 : Asialoderivat des Gangliosids GM_2 in den Fällen der Bahnen II und IV.

7 : Nicht näher identifiziertes Phospholipid

8 : Kephalin

9 : Cholesterin usw.; Front.

Abbildung 6:

Dünnschicht-Chromatogramm der Lipide aus pathologischer und normaler fetaler Leber (je 1.5 mg Trockensubstanz).

Bahnen I, II, VI : 3, 5 und 10 Mikrogramm Test-Sphingomyelin (Doppelfleck).

Bahn III : M. Niemann-Pick Typ C (Fet 4)

Bahn IV : Globoidzellige Leukodystrophie (Fet 5)

Bahn V : Kontrollfet (Fet 1)

Höhe 1 : Sphingomyelin

Höhe 2 : Lecithin

Höhe 3 : Nicht näher identifiziertes Phospholipid

Höhe 4 : Kephalin

Höhe 5 : Hexosyl-Diglycerid (?; vgl. Methodik)

Höhe 6 : Cholesterin

Höhe 7 : Cholesterinester; Neutralfette; Front

Bei Fet 4 (Bahn III) ist Sphingomyelin leicht vermehrt, Lecithin und Kephalin vermindert (vgl. Ergebnisse).

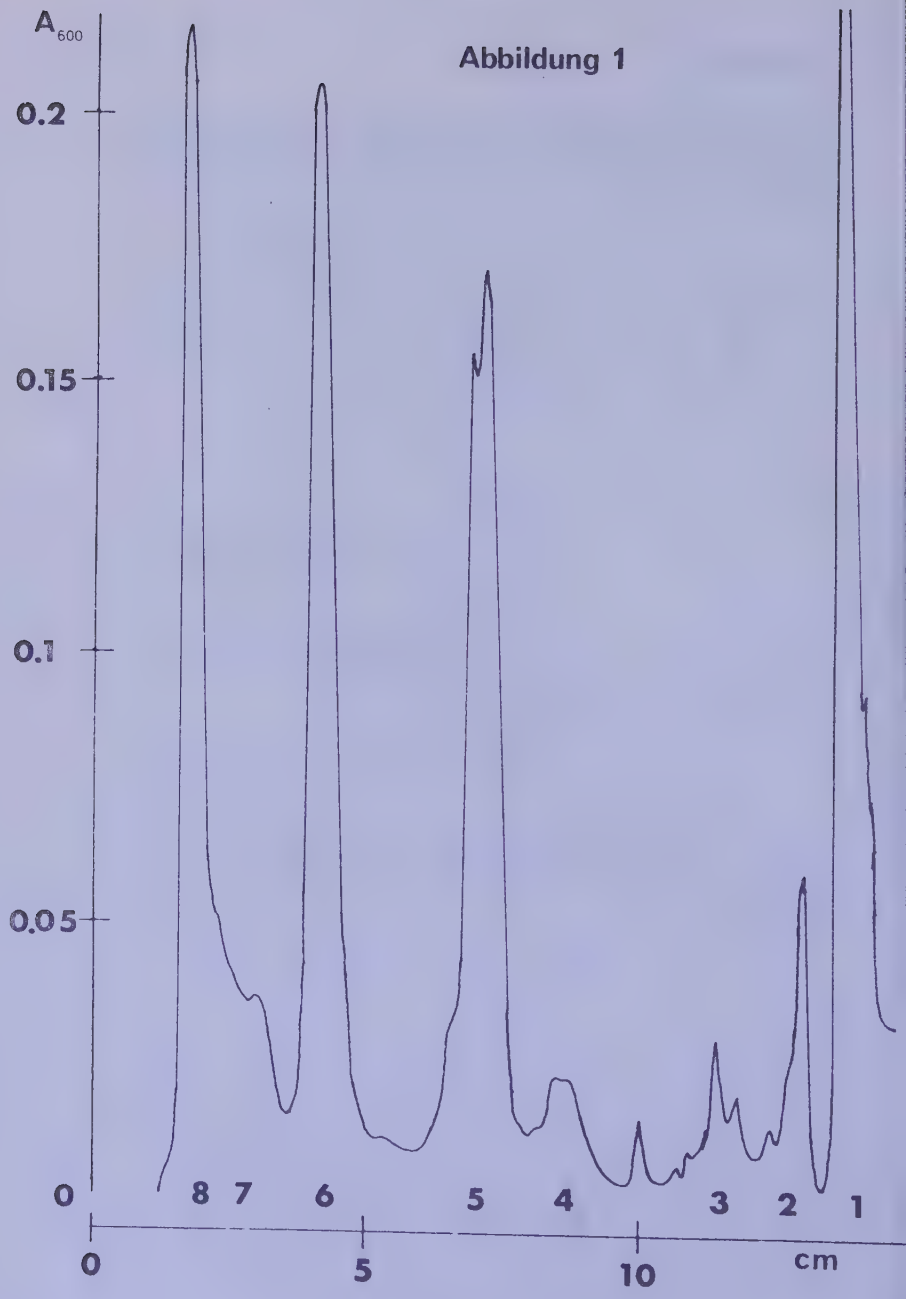

A600
Abbildung 1
0.2
0.15
0.1
0.05
0
8 7 6 5 4 3 2 1
0
5
10
cm

Abbildung 2

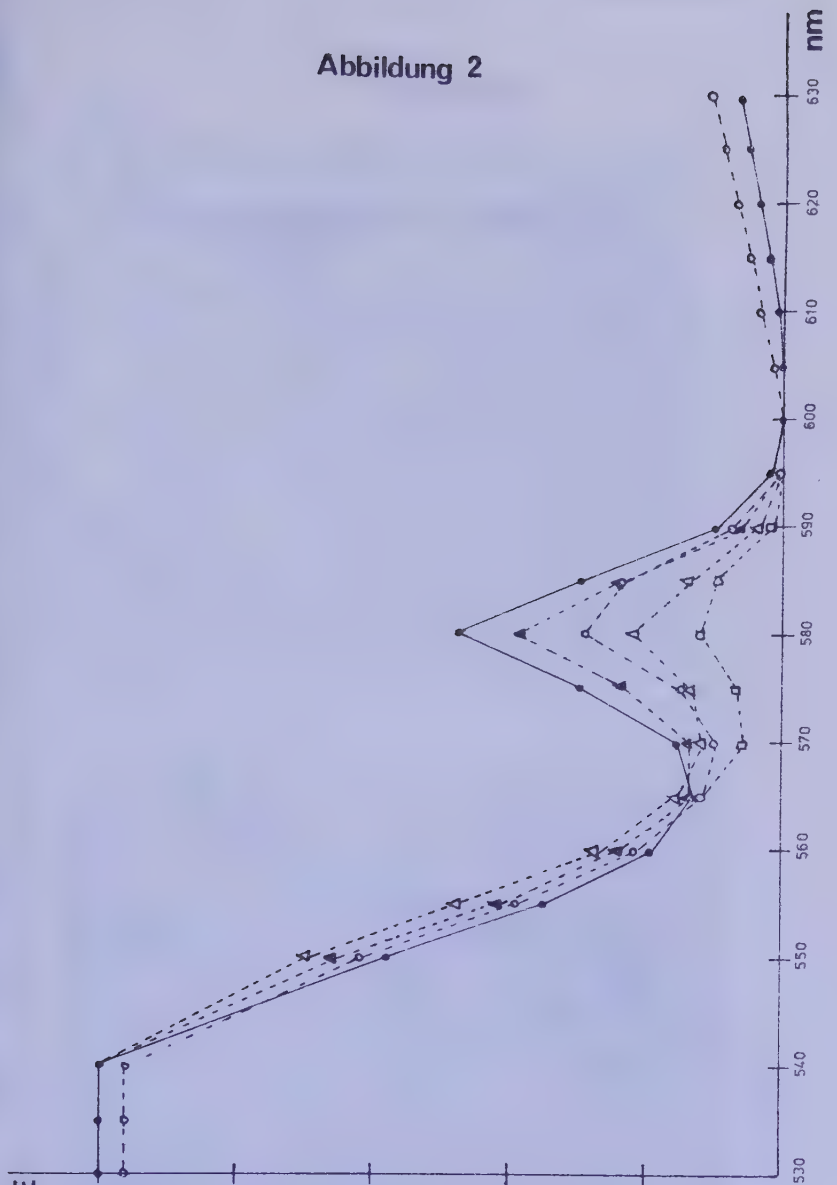
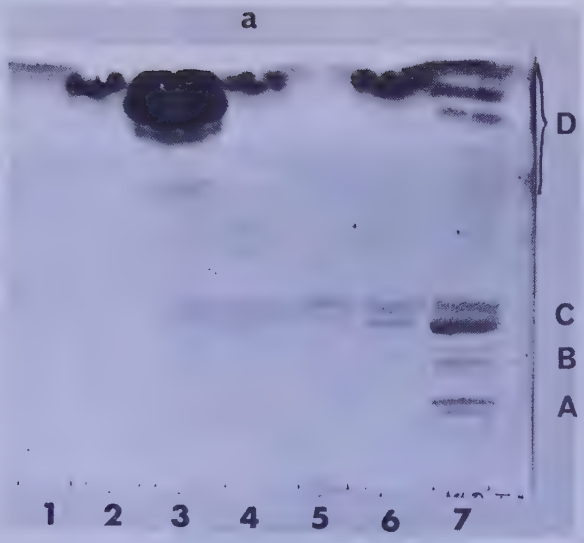


Abbildung 3

Abbildung 4



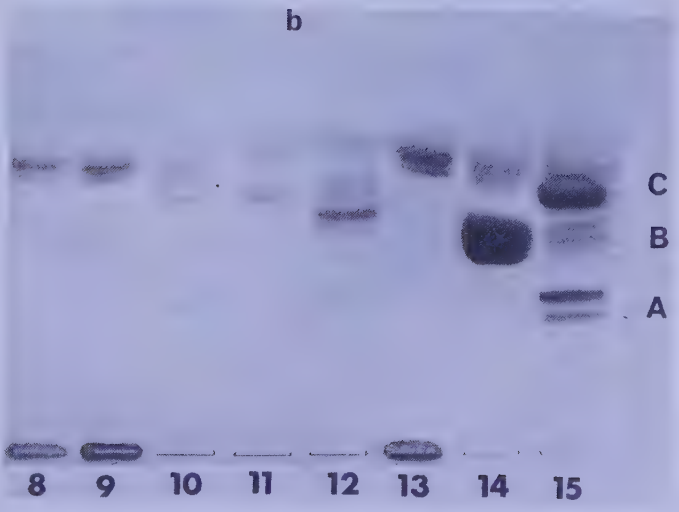


Abbildung 5

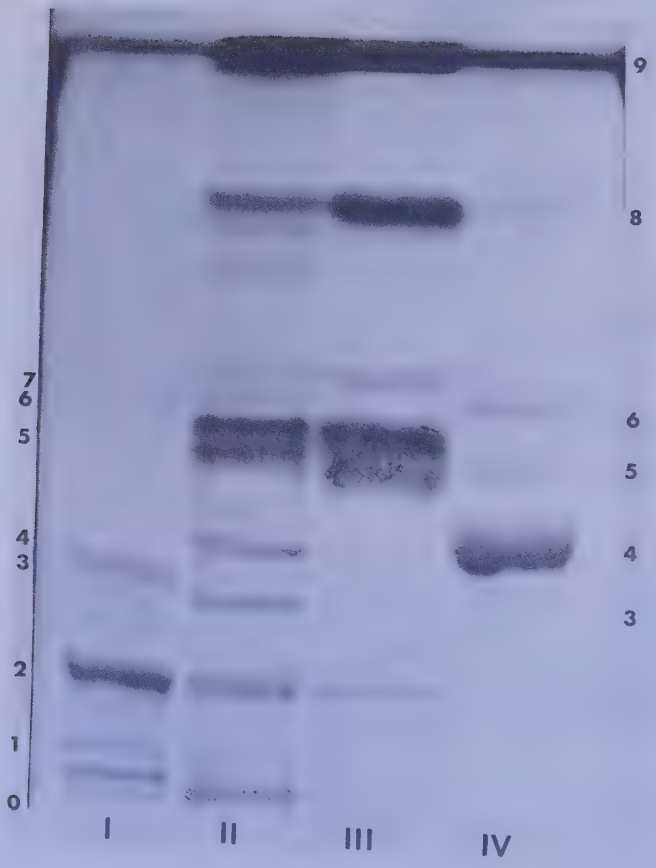
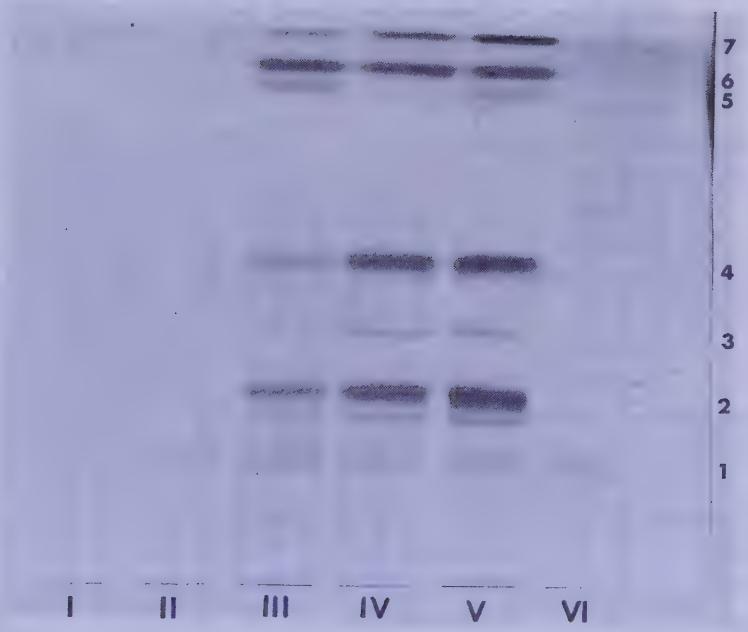


Abbildung 6



GANGLIOSID-FORMELSCHEMA

cer-glc-gal-galNac	Asialoderivat von GM_2
neuNac | cer-glc-gal-galNac	GM_2
neuNac | cer-glc-gal-galNac-gal	GM_1
neuNac neuNac | | cer-glc-gal-galNac-gal	GD_{1a}
neuNac | neuNac | cer-glc-gal-galNac-gal	GD_{1b}
neuNac | neuNac neuNac | | cer-glc-gal-galNac-gal	GT_1

Legende:

cer	Ceramid
glc	Glucose-Rest
gal	Galaktose-Rest
galNac	N-acetyl-Galaktosamin-Rest
neuNac	N-acetyl-Neuraminsäure-Rest
GM_2, GM_1, usw.	Gangliosid-Symbole nach Svennerholm (1963)

Tabelle 1: Untersuchte Feten

Nr. des Feten	Alter (Schwangerschaftswochen)	Sphingolipidspeicherkrankheit	Hauptspeicherlipide	genetisch defektes Enzym
1	26	Kontrolle		
2	21	Metachromatische Leukodystrophie	Sulfatide	Arylsulfatase A = Sulfatidase
3	25	GM_2-Gangliosidose Typ 2 = M. Sandhoff	Gangliosid GM_2 ("Tay-Sachs-Gangliosid")	ß-Hexosaminidasen A und B
4	20	M. Niemann-Pick Typ C	Sphingomyelin. Cholesterin	Enzymdefekt unklar; partieller Defekt der Sphingomyelinase wird diskutiert (Callahan et al. 1975)
5	21	Globoidzellige Leukodystrophie = M. Krabbe	keine (selbst postnatal ist Galaktocerebrosid nur relativ vermehrt)	Cerebrosid-ß-Galaktosidase

Tabelle 2: Lipide in Gehirn, Leber und Niere des Kontrollfeten (Fet 1)

	Gehirn			Leber	Niere
Wasseranteil (% Feuchtgewicht)	87.5			79	89
Lipidanteil (% Trockengewicht)	23			12.5	20
Cholesterin	4.4[+]	3.7		0.85	1.15
Kephalin	4.8			3.2	3.9
Lecithin	5.5			3.8	4.4
Sphingomyelin	n. b.	0.3		0.85	1.05
Ganglioside	1.0	1.0	(0.65[++])	-	-
Substanz X[+++]	1.0			ca. 0.4	ca. 0.7
unidentifiziert	6.0			3.4	8.8

Fußnoten:

[+] Die Werte in der ersten Spalte wurden gravimetrisch, alle übrigen densitometrisch erhalten

[++] umgerechnet, nach Angaben von Schneck et al. (1975)

[+++] Die Substanz X wurde vorläufig als Hexosyl-Diglycerid charakterisiert (s. Methodik)

n. b. nicht bestimmt

Tabelle 3: Sulfatide (mg/g Trockengewicht) in Niere und Leber bei fetaler metachromatischer Leukodystrophie (MLD; Fet 2)

		Gesamt	Gal-Sulf[+]	Lact-Sulf	$\frac{\text{Gal-Sulf}}{\text{Lact-Sulf}}$
Fet 2	Niere	2.4	1.8	0.6	3
	Leber	0.65	0[++]	0.65	
Kontrollfet	Niere	0.7	0.6	0.1[++]	ca. 10
	Leber	0[++]			
postnataler MLD-Fall (2 3/4 Jahre alt)	Niere	41	32	9	3.6
infantiler Kontrollfall[+++]	Niere	0.74	0.54	0.2	2.7

Fußnoten:

[+] Galaktosyl- und Lactosyl-Sulfatid (vgl. Methodik)

[++] Werte unter oder an der Nachweisgrenze

[+++] Angaben nach Martensson et al. (1966)

Tabelle 4: Ganglioside (mg/g Trockengewicht; Nomenklatur nach Svennerholm 1963) im Gehirn bei fetaler GM_2-Gangliosidose Typ 2 (M. Sandhoff; Fet 3)

	GM_2	GM_1	GD_{1a}	GD_{1b} + GT_1	Gesamt	Asialo-GM_2
Fet 3	6.8	6.5	5.9	ca. 0.8	20.0	ca. 0.5
Kontrollfet	0.3	4.2	5.0	ca. 1.0	10.5	
Normwert aus der Literatur	0.06 [+]				7-21 [++]	0.003 [+]

Fußnoten:

[+] umgerechnet, nach Angaben von Schneck et al. (1975)

[++] umgerechnet, nach Angaben von Percy et al. (1973)

Tabelle 5: Lipide (mg/g Trockengewicht) in Leber und Niere bei fetalem M. Niemann-Pick Typ C (Fet 4)

		Sphingomyelin	Lecithin	Kephalin	Cholesterin	Substanz X+
Fet 4	Leber	16.5	26.5	23	27	10
	Niere	12.0	18.5	27.5	13	10
Kontrollfet	Leber	8.5	38	32	8.5	4
	Niere	10. 5	44	39	11.5	7

+ Näherungswerte, vgl. Methodik und Tabelle 2

LEBENSLAUF

Am 29. März 1952 wurde ich, Thomas Schlipf, als Sohn des heutigen Reg.-Verm.-Dir. Hans Schlipf und der Gertrud Schlipf, geb. Arzt, in Nagold geboren. Noch 1952 zog unsere Familie nach Heidenheim, 1956 nach Tübingen. Hier ging ich ab 1959 zur Grundschule, ab 1963 auf ein math.-nat. Gymnasium. Nach dem Abitur 1971 begann ich im Wintersemester 1971/72 an der Universität Tübingen mit dem Studium der Biochemie, im Sommersemester 1972 mit dem Medizinstudium. Im März 1974 bestand ich das Physikum, im September 1974 das Vordiplom in Biochemie, danach exmatrikulierte ich mich für dieses Studienfach. Am 23. März 1975 bestand ich den ersten, am 31. März 1977 den zweiten und am 25.4.1978 den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung.